

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 535号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏 名	森 本 祥 隆		
論文題目	Quantitative evaluation of bone resorption activity of osteoclast-like cells by measuring calcium phosphate resorbing area using incubator-facilitated and video-enhanced microscopy (培養器補助ビデオ強化型顕微鏡下でのリン酸カルシウム吸収面積測定による破骨細胞様細胞の骨吸収活性の定量的評価)		

博士(医学) 森 本 祥 隆

論文題目

Quantitative evaluation of bone resorption activity of osteoclast-like cells by measuring calcium phosphate resorbing area using incubator-facilitated and video-enhanced microscopy

(培養器補助ビデオ強化型顕微鏡下でのリン酸カルシウム吸収面積測定による破骨細胞様細胞の骨吸収活性の定量的評価)

論文内容の要旨

[背景と目的]

破骨細胞は骨吸収能を持った多核の細胞である。破骨細胞の骨吸収能の評価には骨片や象牙片を用いた pit formation assay が行われてきたが、長時間の観察や生細胞の観察は困難であった。近年、骨片に代わり、リン酸カルシウム(以下 CP)コートカバースリップを用いた評価が行われるようになり、またビデオ強化型顕微鏡を用いることにより生細胞のまま長時間の観察が可能となった。

また破骨細胞を大量に得ることは困難であったが、近年、マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養によって破骨細胞の主な機能を有した破骨細胞様細胞(以下 OCL)を大量に得ることが可能となった。

カルシトニン は破骨細胞の吸収阻害薬であり、エルカトニン はウナギから抽出されたカルシトニンアナログでカルシトニンより高い活性を持っている。

しかし破骨細胞の骨吸収能や薬物の影響を定量的に評価した報告はない。

本研究では OCL を生存させたまま CP コートカバースリップ上で培養し、破骨細胞形態と骨吸収能を長時間にわたって定量的に観察するとともに、エルカトニンの影響をビデオ強化型顕微鏡で定量的に評価した。

[材料と方法]

Akatsu らの方法に準じて ddy マウスの骨芽細胞と骨髄細胞をコラーゲンゲル上で 5~7 日間の共存培養し OCL を得た。それをコラゲナーゼ処理して細胞を剥離し、得られた細胞を CP コートカバースリップ上で 2 時間培養し、培養器補助ビデオ強化型顕微鏡で位相差観察した。位相差像は CCD カメラで取得し、5 分間隔で 8 時間撮影しコンピュータのハードディスクに記録した。エルカトニンによる影響を評価するため、観察開始から 4 時間後に最終濃度 10^{-11} M でエルカトニンを添加し、さらに 4 時間の観察を行った。

OCL の吸収活性を示す、細胞が形成した CP 吸収領域は CP 基質とのコントラストで容易に確認され、その面積を画像取得解析システムで測定した。

[結果]

OCL と CP 吸収領域の形態変化の観察では CP 吸収領域は 8 時間にわたって経時的に増大していた。OCL には多数の活発な液胞が観察され、多数の核が集合して存在していた。エルカトニンを添加した影響を見ると、添加以降 4 時間は CP 吸収領域は拡大せず、集合していた核は離散していた。

CP 吸収領域の解析では、24 個の OCL 単独群と、26 個のエルカトニン添加群の OCL を観察した。OCL 単独群では観察開始から CP 吸収領域の面積は増大しており、観察開始から 1 時間と 5~8 時間の各点、2 時間と 7~8 時間の各点、3 時間と 8 時間との間にそれぞれ有意差が見られた。最初の 4 時間と次の 4 時間の面積増加量には有意差が見られず、経時的に増加していると言えた。エルカトニン添加群では CP 吸収領域の面積は観察開始からエルカトニン添加前まで有意に増大していたが、以降、有意差は見られ

なかった。これはエルカトニン添加前までは CP 吸収領域の面積は増加していたが、それ以降は停滞していたことを示している。最初の 4 時間の CP 吸収領域の面積増加を OCL 単独群とエルカトニン添加群の間で比較してみると有意差は見られず、次の 4 時間ではエルカトニン添加群で有意に面積増加が少なかった。

[考察]

本研究において、マウス OCL を CP コートカバースリップ上で培養し培養器補助ビデオ強化型顕微鏡で吸収領域の変化を測定し、細胞の活性とエルカトニンの影響を評価した。CP 吸収領域面積測定の定量的解析は OCL の吸収能力を薬剤添加など様々な状況下でも同一の細胞で生存させたまま評価できることを示した。我々のシステムは一度の実験で同時に多数の細胞を生存したまま連続して長時間観察することができる点でこれまでの報告より利点がある。本研究では多数の活発な液胞が CP 吸収領域周辺に観察され、液胞が骨吸収活性に関係していることが示唆された。またエルカトニン添加で集合していた核が離散することを捉え、エルカトニンが骨吸収活性を弱めるだけでなく核の極性をも変化させることを示した。この方法では定量的に破骨細胞の骨吸収活性を評価するのみではなく、様々な治療薬を用いた細胞の形態的变化を同一の破骨細胞で評価することが可能である。

[結論]

培養器補助ビデオ強化型顕微鏡を用いて OCL の吸収領域を解析することで、*in vitro* で様々な治療薬の骨吸収活性への影響を定量的に評価することが可能である。

論文審査の結果の要旨

破骨細胞は骨吸収能を持った多核の細胞である。破骨細胞の骨吸収能の評価にはこれまで骨片や象牙片を用いた pit formation assay が行われてきたが、長時間の観察や生細胞の観察は困難であった。近年、骨片に代わり、リン酸カルシウムコートカバースリップを用いた評価が行われるようになり、またビデオ強化型顕微鏡を用いることにより生細胞のまま長時間の観察が可能となった。またこれまで破骨細胞を大量に得ることは困難であったが、近年、マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養によって破骨細胞の主な機能を有した破骨細胞様細胞を大量に得ることが可能となった。一方、カルシトニンは破骨細胞の骨吸収阻害薬であるが、破骨細胞の骨吸収能へのカルシトニンの影響を直接定量的に評価した報告はない。そこで、本研究において申請者等は破骨細胞様細胞を生存させたままリン酸カルシウムコートカバースリップ上で培養し、破骨細胞形態と骨吸収能を長時間にわたって定量的に観察するとともに、カルシトニンアナログであるエルカトニンの影響をビデオ強化型顕微鏡で定量的に評価し解析した。

Akatsu らの方法に準じて ddy マウスの骨芽細胞と骨髄細胞をコラーゲンゲル上で 5～7 日間共存培養し破骨細胞様細胞を得た。それをコラゲナーゼ処理して細胞を剥離し、得られた細胞をリン酸カルシウムコートカバースリップ上で 2 時間培養し、培養器補助ビデオ強化型顕微鏡で位相差観察した。位相差像は CCD カメラで取得し、5 分間隔で 8 時間撮影しコンピュータのハードディスクに記録した。エルカトニンによる影響を評価するため、観察開始から 4 時間後に最終濃度 10^{-11} M でエルカトニンを添加し、さらに 4 時間の観察を行った。

破骨細胞様細胞とリン酸カルシウム吸収領域の形態変化の観察では、リン酸カルシウム吸収領域は 8 時間にわたって経時的に増大していた。破骨細胞様細胞には多数の活発な液胞が観察され、多数の核が

集合して存在していた。エルカトニンを添加した影響を見ると、添加以降 4 時間ではリン酸カルシウム吸収領域は拡大せず、集合していた核は離散していた。

エルカトニン添加群ではリン酸カルシウム吸収領域の面積は観察開始からエルカトニン添加前まで有意に増大していたが、添加以降は有意差が見られなかった。これはエルカトニン添加前まではリン酸カルシウム吸収領域の面積は増加していたが、それ以降は停滞していたことを示している。最初の 4 時間ではリン酸カルシウム吸収領域の面積増加を破骨細胞様細胞単独群とエルカトニン添加群の間で比較してみると有意差は見られず、次の 4 時間ではエルカトニン添加群で有意に面積増加が少なかった。

本研究に用いたシステムは一度の実験で同時に多数の細胞を生存したまま連続して長時間観察することができる点でこれまでのシステムより利点がある。本研究では多数の活発な液胞がリン酸カルシウム吸収領域周辺に観察され、液胞が骨吸収活性に関係していることが示唆された。またエルカトニン添加で集合していた核が離散することを捉え、エルカトニンが骨吸収活性を弱めるだけでなく核の極性をも変化させることを示した。この方法では定量的に破骨細胞の骨吸収活性を評価するのみではなく、様々な治療薬による細胞の形態的变化を同一の破骨細胞で評価することが可能である。今後、培養器補助ビデオ強化型顕微鏡を用いて破骨細胞様細胞の吸収領域を解析することで、*in vitro* で様々な治療薬の骨吸収活性への影響を定量的に評価することが可能である。

審査委員会では、破骨細胞機能の新しい解析システムを確立した点、またカルシトニンの影響をビデオ強化型顕微鏡で初めて定量的に評価し解析した点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 破骨細胞が多核になるメカニズムについて
- 2) 破骨細胞のカルシウム吸収メカニズムについて
- 3) 破骨細胞の分化因子について
- 4) 骨芽細胞の培養法について
- 5) 塩酸の分泌による pH の変化について
- 6) カルシトニンの作用機序について
- 7) ddy マウスを用いた理由について
- 8) 培養環境の破骨細胞に及ぼす影響について
- 9) 実験に用いる骨基質について
- 10) 整形外科領域における本研究の位置づけについて

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した

論文審査担当者

主査 佐藤 康二

副査 金山 尚裕 堀内 健太郎